

Aula P2: fracionamento celular e verificação da atividade de Succinato Desidrogenase

1. Fracionamento celular

Princípio do método

O objetivo do fracionamento celular é separar os componentes intracelulares para medir atividades específicas. Em geral, são utilizadas propriedades físico-químicas distintas de cada componente intracelular para proceder sua purificação ou enriquecimento. Métodos baseados em densidade, como a centrifugação diferencial utilizada aqui, são muito úteis pois permitem separar componentes celulares com grandes diferenças de densidade. Para isso, o extrato celular total, obtido após o rompimento controlado da membrana plasmática, é centrifugada em velocidades crescentes, correspondendo a forças centrífugas cada vez maiores, de modo que os componentes mais densos vão sendo sedimentados serialmente.

Atenção: o procedimento de fracionamento celular será executado pelos monitores. Os alunos receberão alíquotas da fração celular I e da fração celular II em tubos. Os tubos deverão sempre ser mantidos em gelo.

Procedimento

1. Mergulhar metade de um fígado de galinha (obtido de fontes comerciais) em 20 ml de uma solução de sacarose 0,25M (previamente resfriada a 0 graus), picando-o bem com a tesoura.
2. Decantar e descartar o sobrenadante.
3. Adicionar outros 20 ml da solução de sacarose, misturar, tornar a decantar e descartar o sobrenadante.
4. Adicionar outros 20 ml de sacarose 0,25M, homogeneizar o fígado picado em homogeneizador tipo Potter.
5. Centrifugar o homogenato a 4.000 rpm por 10 minutos. Você obterá o precipitado 1 e um sobrenadante 1.
6. Transferir o sobrenadante 1 para novo tubo e centrifugá-lo novamente a 10.000 rpm por 30 minutos. Você obterá, então, o precipitado 2 e o sobrenadante 2.
7. Recolher o sobrenadante2 com uma pipeta Pasteur em um tubo de ensaio e conservá-lo no gelo. Esta será a **fração celular I**.

8. Suspender o precipitado 2 obtido em 4 ml de sacarose 0,25 M gelada. Esta será a **fração celular II**.
9. Manter a fração celular I e a fração celular II em gelo.

2. Identificação da atividade de succinato desidrogenase

Princípio do método

A enzima succinato desidrogenase, também conhecida como Complexo II da cadeia transportadora de elétrons, é uma enzima da membrana mitocondrial interna que catalisa a oxidação de succinato a fumarato, com a concomitante redução de FAD^+ para FADH_2 . O azul de metileno é um corante que pode apresentar-se na forma oxidada (azul) ou reduzida (incolor). A redução do azul de metileno pode ser obtida a partir da oxidação do succinato, catalisada pela succinato desidrogenase, de forma que em um sistema contendo azul de metileno e succinato, sua redução, acompanhada pela mudança de coloração de azul para incolor, pode ser utilizada para medir a atividade de SDH

Antes de iniciar a experiência o grupo deve:

1. escrever a reação que está sendo analisada;
2. discutir as funções do succinato, sacarose, azul de metileno e óleo mineral;
3. planejar o controle da experiência.

Procedimento

1. Montar as reações de acordo com a tabela **Protocolo 1**. Pipetar na seguinte ordem todos as 5 soluções: água destilada, tampão A, Sacarose 0,7 M, Succinato 0,5 M, Azul de metileno, Fração celular (antes de pipetar a respectiva fração celular, homogeneizar eppendorff em que está contida por inversão).
2. Após pipetar a respectiva fração celular, homogeneizar os tubos de ensaio e então adicionar o Nujol, escorrendo pela parede interna do tubo. **Após pingar Nujol, não vortexar ou agitar.**
3. Incubar as reações a 37°C , por 15 minutos.
4. Observar os tubos, se há alguma diferença de cor e turbidez.
5. Identificar qual fração celular contém atividade de SDH a partir da alteração de cor.
6. Deixar os tubos contendo as reações na bancada, eles não serão utilizados para o próximo teste.

PROTOCOLO 1

TUBO	1	2	3	4	5
Tampão A	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml
Sacarose 0,7M	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Succinato 0,5M	-	-	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Azul de Metileno	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Água Destilada	1.5 ml	1.5 ml	1.3 ml	1.3 ml	1.4 ml
Fração Celular	100µL (I)	100µL (II)	100µL (I)	100µL (II)	-
Nujol(óleo mineral)	6 gotas	6 gotas	6 gotas	6 gotas	6 gotas

3. Inibição da atividade de SDH por malonato

Princípio do método

A inibição de atividades enzimáticas por inibidores competitivos e/ou alostéricos desempenha um papel muito relevante no controle das velocidades de reações importantes do metabolismo energético. Além disso, a caracterização dos efeitos de inibidores sobre a atividade de certas enzimas foi fundamental no processo de elucidação de várias vias bioquímicas, como é o caso do Ciclo de Krebs. Sabendo em que fração celular se encontra a atividade da SDH, iremos medir o efeito do malonato (ver baixo), um análogo do succinato não encontrado em células de mamíferos, sobre a atividade de SDH. Este efeito foi muito importante na elucidação das etapas de ciclo de Krebs. Para este ensaio, iremos utilizar a redução do MTT ((3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio) por SDH como indicador dessa atividade. O MTT é amarelo quando oxidado e violeta quando reduzido, não sendo reoxidado pelo O₂ do ar.

Procedimento

1. Montar as reações de acordo com a tabela **Protocolo 2**, pipetando em tubos de ensaio na seguinte ordem: água destilada, tampão A, Malonato 0,5M, Succinato 0,5M, MTT.
2. A fração celular utilizada será a que foi identificada no protocolo 1. A fração pipetada deve ser a que está contida no microtubos de centrifugação (ependorff)

que foi distribuído previamente. Homogeneizar a fração celular antes de pipetar nos tubos.

3. Homogeneizar as reações nos tubos de ensaio após colocar a fração celular.
4. Em seguida, pipetar 200µL da reação do tubo de ensaio em cada poço de placa de leitura de absorvância (um poço por tubo, então serão 7 poços no total).
5. Incubar as reações por 5 minutos, a temperatura ambiente. Acompanhar alterações de cor de cada reação. Quando faltarem 30 segundos para o término da incubação, levar a placa até o espectrofotômetro.
6. Medir a absorvância das reações a 492nm. Anotar valores.

Baseado nos resultados, é possível dizer se a inibição é competitiva ou não competitiva?

PROTOCOLO 2

TUBO	1	2	3	4	5	6	7
Tampão A	0.2 ml						
Malonato 0,5M	-	-	-	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Succinato 0,5M	-	0.1 ml	0.2 ml	-	0.1 ml	0.2 ml	0.4 ml
MTT	25µl						
Água Destilada	0.6 ml	0.5 ml	0.4 ml	0.5 ml	0.4 ml	0.3 ml	0.1 ml
Fração Celular	0.2 ml						

Soluções:

- Tampão (A) para fracionamento Celular para 1 Litro

Tris	0,1M
KH ₂ PO ₄	0,05M
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,01M
EDTA	0,02M

Dissolver com aproximadamente 700ml de água destilada.

Acertar o pH 7,4, com HCl 5N.

Completar o volume para 1 litro.

- Sacarose 0,7M

Dissolver em água destilada.

- Sacarose 0,25M

Dissolver em água destilada.

- Succinato de Potássio 0,5M

Dissolver o ácido succínico em água destilada

Acertar o pH 7,0 com pastilhas de KOH.

Completar o volume desejado.

- Malonato 0,5M

Dissolver com água destilada.

Acertar o pH 7,0 com KOH.

Completar o volume desejado.

- Azul de Metileno 0,03%

Dissolver em água destilada.

- MTT 1% (dimethiazol)

Dissolver em água destilada.

Distribuição das soluções:

- 100 ml de Sacarose 0,25 M
- 10 ml de água destilada
- 10 ml de Sacarose 0,7 M
- 10 ml de Tampão A
- 5 ml de Succinato 0,5 M
- 5 ml de Azul de Metileno 0,03%
- 5 ml de Malonato 0,5 M
- 2 ml de MTT 1% (em eppendorf)
- 1 frasco com conta-gotas ou pipeta Pasteur de Nujol

VIDRARIAS

- Homogeneizador / Centrífuga Refrigerada / Balança / Copos / Gelo
- Banho 37°C
- 2 Tubos de Centrífuga
- 1 Tesoura
- Béquers 100 ml
- 1 Proveta 25 ml
- 1 Frasco de descarte
- 3 Tubos de ensaio
- 1 Erlenmeyer com água destilada
- 2 Bastões de vidro
- 24 Tubos de ensaio médio
- 2 pipetas Pasteur com pera.
- Pipetas: 5 de 0,5 ml, 1 de 2 ml, 3 de 0,1 ml, 1 de 1,0 ml